

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

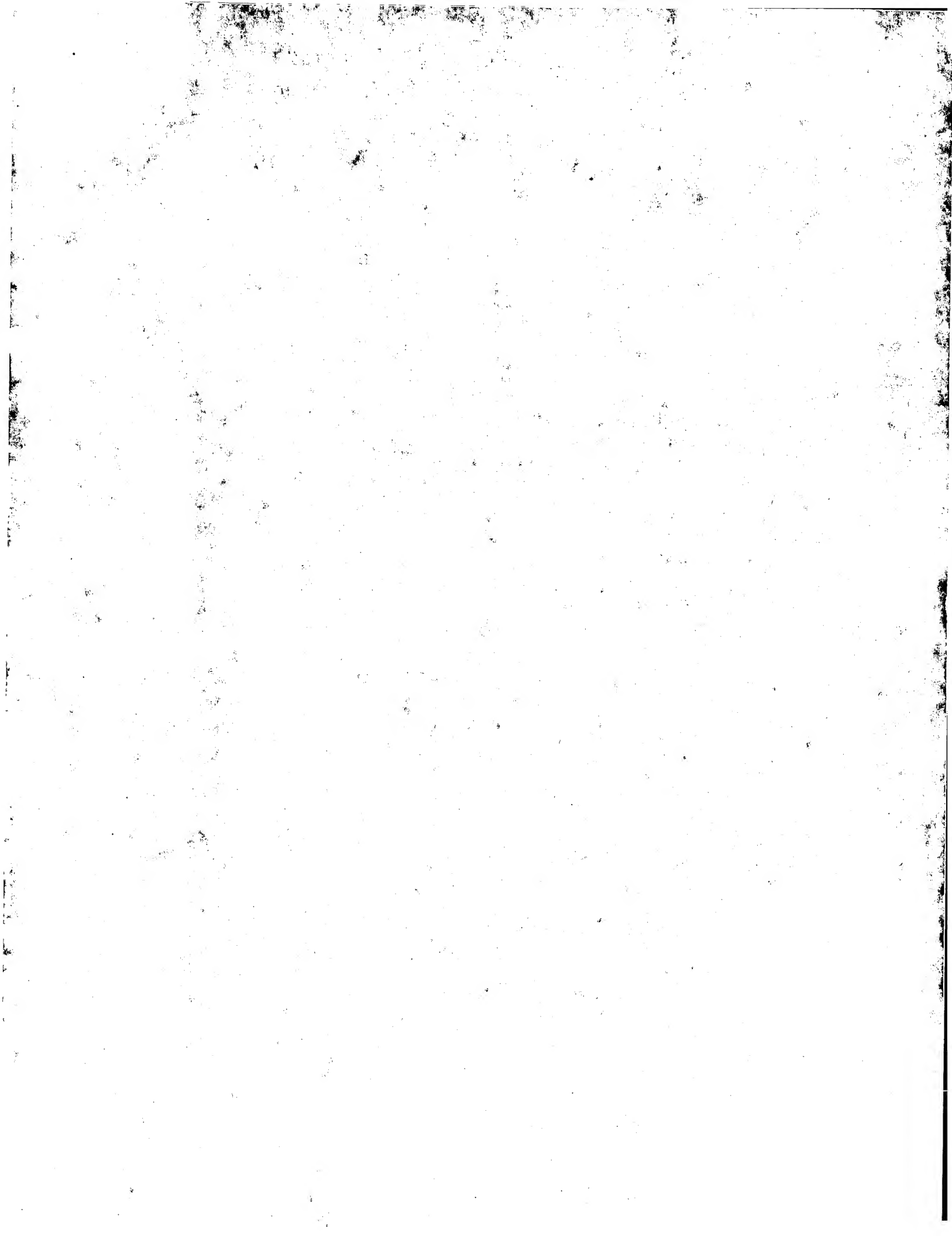
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局



(43) 国际公布日:  
2002年1月10日(10.01.02)

PCT

(10) 国际公布号:  
WO 02/02776 A1

(51) 国际分类号: C12N 15/53, 9/04, 15/82, A01H 5/00

(21) 国际申请号: PCT/CN01/00294

(22) 国际申请日: 2001年2月27日(27.02.01)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
00109779.2 2000年7月6日(06.07.00) CN  
01104432.2 2001年2月26日(26.02.01) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 中国科学院微生物研究所(INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村北一条13号, Beijing 100080 (CN).

(72) 发明人:及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 田波(TIAN, Bo) [CN/CN]; 王芳(WANG, Fang) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村北一条13号, Beijing 100080 (CN).

(74) 代理人: 中科专利商标代理有限责任公司(CHINA SCIENCE PATENT & TRADEMARK AGENT

LTD); 中国北京市海淀区海镜路80号中科大厦16层, Beijing 100080 (CN).

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(CH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A METHOD OF IMPROVING NITROGEN ASSIMILATION EFFICIENCY IN PLANTS

(54) 发明名称: 一种提高植物氮素同化效率的方法

(57) A abstract: The present invention provides a method of improving nitrogen assimilation efficiency in plants, comprising: (a) connecting the fungus glutamate dehydrogenase (GDH) gene with a promoter which could lead to the expression of an exogenous gene in plants to construct the chimeric gene, (b) introducing the constructed chimeric gene into the plant cells, screening and culturing the transformed plant.

(57) 摘要

本发明提供了一种提高植物氮素同化效率的方法, 包括: (a) 将真菌谷氨酸脱氢酶(GDH)基因与一种可在植物中引导外源基因表达的启动子相连, 构建嵌合基因; (b) 将构建的嵌合基因导入植物细胞中, 筛选并培养出被转化的植株。

WO 02/02776 A1

## 一种提高植物氮素同化效率的方法

### 技术领域

本发明涉及一种提高植物氮素同化效率的方法。

### 5 技术背景

氮素是植物生长所需的第一大营养元素。目前农业上所施用的氮肥仅有 30%-40% 被植物吸收利用，大部分都浪费。有一部分转化为硝酸盐流失到土壤中，造成环境污染。转 GDH 的作物能有效增加植物氮素的吸收，提高氮肥利用率，从而可以节约氮肥的施用量，起经济效益是巨大的。同时，GDH 广泛存在于动植物和微生物中，  
10 因此转 GDH 的植物对人和动植物不会产生危害。

现在主要有美国、澳大利亚等国家进行谷氨酸脱氢酶转基因植物的研究（美国专利 NO.5955651；5985634；5998700）。它们的谷氨酸脱氢酶基因主要来源于小球藻和大肠杆菌，模式植物为烟草、玉米等经济作物。经研究发现，转谷氨酸脱氢酶基因的植物其氮素利用率有所提高，表现在植物叶片较大且数量较多。转大肠杆菌  
15 GDH 的植物不同组织的含氮量经测定比对照组多 16% 左右，同时不同组织中氨基酸含量有所变化。较为显著的是，谷氨酸含量明显较低，而丙氨酸、赖氨酸、天冬氨酸等含量增加较大。转 GDH 基因土豆的淀粉含量较对照组明显增多。但目前为止所使用的谷氨酸脱氢酶的活性多较低。

### 发明公开

20 本发明的目的是提供一种提高植物氮素同化效率的方法。

为达到上述目的，本发明提供了一种提高植物氮素同化效率的方法，包括：(a) 将真菌谷氨酸脱氢酶（GDH）基因与一种可在植物中引导外源基因表达的启动子相连，构建嵌合基因；(b) 将构建的嵌合基因导入植物细胞中，筛选并培养出被转化的植株。

25 在本发明的方法中，所述的可在植物中引导外源基因表达的启动子可以是任何一种现有技术中已知的可在植物中引导外源基因表达的启动子。所述的谷氨酸脱氢酶基因最好是辅基 NADP 谷氨酸脱氢酶基因或辅基 NAD 谷氨酸脱氢酶基因。所述的真菌谷氨酸脱氢酶基因可以来自丝状真菌的脉孢霉属真菌，包括中间脉孢霉、好食脉孢霉、粗糙脉孢霉。所述的谷氨酸脱氢酶基因也可以来自酵母真菌，例如啤酒  
30 酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）。所述的谷氨酸脱氢酶基因还可以来自担子菌，例

如双孢菇 (*Agaricus bisporus*)。所述的植物可以是烟草、玉米、棉花或水稻。

在本发明的方法中,所述的谷氨酸脱氢酶可以来自中间脉孢霉 *Neurospora intermedia*(简称 Ni)的谷氨酸脱氢酶,它具有 SEQ ID NO: 1 所示的序列。编码上述的谷氨酸脱氢酶的基因可以具有 SEQ ID NO: 2 所示的序列。

5 本发明的方法中,所述的谷氨酸脱氢酶可以来自好食脉孢霉 *Neurospora sitophila*(简称 Ns),它具有 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。编码上述的谷氨酸脱氢酶基因可以具有 SEQ ID NO: 4 所示的序列。

我们将 Ni-GDH, Ns-GDH, Nc-GDH 三种脉孢霉属基因克隆进大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行诱导表达,纯化的 Ni-GDH, Ns-GDH, Nc-GDH 进行酶活性测定,发现  
10 三种 GDH 的酶活性高于其他属的脉孢霉。它对氨的亲合力和稳定性都较强。将这三种 GDH 基因亚克隆到植物表达载体 pROKII 中,通过农杆菌转化,电激法转化和花粉管通道法转化烟草、玉米、棉花等作物。经 PCR、Southern、Northern 和酶活性染色鉴定,筛选出 P8<sup>+</sup>性转化子。将其移至不同氮浓度的培养基中,发现在低氮  
15 5mM 至更低的氮离子浓度下,表达 GDH 的烟草都能正常生长,而未转化的对照组的叶片黄化,发育受阻,呈现缺氮症状。测定植物在低氮条件下的含氮总量及未利用氮残留量,发现转真菌 GDH 植株的含氮量较未转化的高 20% 以上,氮残留量减少 20—30%。测定植株在贫氮土壤中的总氮量,结果较未转化植株高 40% 左右。同时我们构建了转 GDH 基因的玉米、水稻、棉花等经济作物,发现其含氮量较未转化  
20 作物高 20—30% 土壤中氮残留量减少 20% 以上。检测表明, GDH 在上述植物中得到了高表达,它加快了谷氨酸的氧化脱氨和  $\alpha$ -酮戊二酸 (2-oxoglutarate) 的还原氨基化作用,使植物中启动了一条新的氮利用途径,从而提高了氮的利用率。高等植物中虽也有 GDH,但其对氨的亲合力只有真菌 GDH 的 1/10 至 1/100,故不能发挥同化氮的作用。真菌 GDH 使谷氨酸的氧化脱氨伴随着大量 ATP 的释放和  $\alpha$ -酮戊二酸 (2-oxoglutarate) 的形成,这给植物提供充足的能量和大量参与三羧酸循环的  
25 碳水化合物。氮素是植物生长所需的第一大营养元素,目前农业上所施用的氮肥仅有 30%—40% 为作物吸收利用,大部分都流失,造成环境污染。而转 GDH 的作物能够有效地提高氮素利用率,从而可以节约氮肥的利用量,减少环境污染,其经济效益是十分巨大。

## 30 实施例

实施例 1. 脉孢霉属真菌、啤酒酵母和双孢菇的培养及其谷氨酸脱氢酶的诱导

1. 将三种真菌由固体斜面转于麦芽汁培养基中, 250 转 / 分钟摇床培养 48 小时离心收集菌丝体, 转入氨诱导培养基(4%葡萄糖, 0.02MNH<sub>4</sub>AC, 0.04MKNO<sub>5</sub>) 中诱导 3 小时, 离心收集菌丝体。
2. 总 RNA 的抽提和逆转录—聚合酶链式反(RT—PCR)方法扩增谷氨酸脱氢酶基因: 诱导后的菌丝体经液氮研磨破碎后, 采用异硫氰酸胍法抽提总 RNA 进行逆转录—聚合酶链式反应。

所用引物如下:

- 10 引物 1: 5' GCTCAGAATGTCTAACCTTCCCTCTGAG 3'  
引物 2: 5' GCGAGCTCTAGTCTTGGACCACCAGTCACC 3'.

逆转录反应条件是:

- 65°C 1 分钟,  
30°C 5 分钟,  
15 30°C—65°C 30 分钟,  
98°C 5 分钟,  
5°C 5 分钟。

聚合酶链式反应条件:

- 94°C 3 分钟,  
20 94°C 1 分钟  
55°C 1 分钟 25 个循环  
72°C 2 分钟  
72°C 10 分钟

25 3. 脉孢霉属谷氨酸脱氢酶(GDH)基因序列测定:

将 RT—PCR 方法扩增的谷氨酸脱氢酶(GDH)基因经琼脂糖凝胶电泳回收。取 3 微升(ul)回收产物, 加入 1ul pGEM-T easy 载体, 5ul 2xT4 连接酶缓冲液, 1ul DNA 连接酶, 4°C 酶连过夜。次日, 将酶连产物转化大肠杆菌 DH50a 进行菌落筛选。筛选方法采用菌落 PCR 和酶切鉴定, 酶切位点为 XbaI、SacI。酶切产生 3.0kb 和 1.4kb  
30 两条带者为阳性克隆 pT—GDH。挑取阳性克隆, 进行序列测定。

#### 4. 啤酒酵母和双孢菇谷氨酸脱氢酶(GDH)基因序列测定:

将 RT-PCR 方法扩增的谷氨酸脱氢酶(GDH)基因经琼脂糖凝胶电泳回收。取 3 微升( $\mu$ l)回收产物, 加入 1 $\mu$ l pGEM-T easy 载体, 5 $\mu$ l 2xT4 连接酶缓冲液, 1 $\mu$ l DNA 连接酶, 4 $^{\circ}$ C 酶连过夜。次日, 将酶连产物转化大肠杆菌 DH50a 进行菌落筛选。筛选方法采用菌落 PCR 和酶切鉴定, 酶切位点为 XbaI、SacI。酶切产生 3.0kb 和 1.4kb 两条带者为阳性克隆 pT-GDH。挑取阳性克隆, 进行序列测定。

#### 5. 脉孢霉、啤酒酵母和双孢菇谷氨酸脱氢酶基因在大肠杆菌中的表达

载体 pT-GDH 经 XbaI、SacI 酶切, 琼脂糖电泳回收得到 GDH 片段, 与经同样酶切的 pBluescript 载体在 4 $^{\circ}$ C 酶连过夜。次日转化大肠杆菌 DH50a, 经菌落 PCR 和酶切鉴定阳性克隆 pBlueGDH。pBlueGDH 经 EcoRV、SacI 酶切, 琼脂糖电泳回收得到 GDH 片段, 与经同样 EcoRV、SacI 酶切的 pET30a 载体在 12 $^{\circ}$ C 酶连过夜。次日转化大肠杆菌 DH50a, 经菌落 PCR 和酶切鉴定, 阳性克隆为 pETGDH。次日, 挑取阳性克隆, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)。培养至 OD0.4 左右, 经 1mM IPTG 诱导 4hr, 收获菌体。菌体经去离子水洗涤后, 超声裂解。离心, 上清和沉淀分别进行 10% SDS-PAGE 电泳。结果证明表达产物以为包涵体形式存在。

#### 6. 金属整合亲和层析纯化谷氨酸脱氢酶

配制含 8M 尿素的 MCAC-0 溶液(20mm/L Tris · Cl, pH7.9, 0.5mol/L NaCl, 10%(v/v)甘油, 1mmol/L PMSF)。同时配制 MCAC-40, MCAC-60, MCAC-80, MCAC-100, MCAC-200, MCAC-500, 即在 MCAC-0 中分别添加 0.4mol/L、0.6mol/L、0.8mol/L、1mol/L、2mol/L、5mol/L 的咪唑。

将谷氨酸脱氢酶包涵体溶于含 8M 尿素的 MCAC-0 溶液中, 上样于 NTA 层析柱中, 以 20—30ml/h 的流速用 5ml 8M Urea-MCAC 缓冲液洗柱, 弃流出液。以分段洗脱的方式依次用 5ml 下列缓冲液洗柱, 8M Urea-MCAC40, 8M Urea-MCAC60, 8M Urea-MCAC80, 8M Urea-MCAC100, 8M Urea-MCAC200, 8M Urea-MCAC500, 分别收集流出液, 进行 10% SDS-PAGE 电泳, 银染进行纯度鉴定。收集 8M Urea “MCAC200 以后的洗脱液, 进行透析复性。透析缓冲液分两种, 分别为 pH8.5 和 pH7.4 的 0.1mol/L Tris.HCl, 1mM EDTA。

## 7. 谷氨酸脱氢酶活性测定

将透析过夜的复性蛋白离心, 收集上清, 经 280nm 紫外检测测定蛋白浓度, 浓度(mg / ml)=A280 x 0.825。在体系 A、体系 C 中分别测定酶活。

### 5 体系 A 测定 GDH 还原氨化作用。

2.55ml 0.1MTris.HCl, 1mMEDTA, pH7.4

0.1ml 0.1MNH<sub>4</sub>Cl

0.15ml 0.2M α-酮戊二酸

0.2ml 0.15%(W / V)NADPH

10 2ul 复性蛋白, 25℃温育 10 分钟, 在 25℃ 恒温下测定体系 A 在 340nm 光吸收值的变化。

体系 C, 测定 GDH 氧化脱氨作用:

2.8ml 0.16M 谷氨酸单钠盐溶于 0.1M Tris.HCl, 1mM EDTA, pH 8.5 的缓冲  
15 液中, 0.2ml 0.2%NADP, 2ul 复性蛋白, 37℃温育 10 分钟后, 测定在 340nm 光吸收值的变化。

活性单位为每分钟还原每一微摩尔 NADP<sup>+</sup>为一单位或每分钟氧化每一微摩尔 NADPH 为一单位。

20

结果测定为在体系 A 中 Ni-GDH 活性单位为 109.92U / mg, 在体系 C 中, 为 Ni-GDH 为 72.93U / mg, Ns-GDH 在体系 A 中为 95.37U/mg, 在体系 C 中为 63013U/mg, Nc-GDH 在体系 A 中为 100.25U/mg, 在体系 C 中为 65.00U/mg。

### 25 8. 脉孢霉谷氨酸脱氢酶基因亚克隆入植物表达载体 pROKII

从 pT-GDH 载体上用 XbaI、SacI 双酶切将 GDH 基因片段切下, 经琼脂糖电泳回收后, 与经同样酶切的 pROKII 载体在 4℃ 酶连过夜。次日转化大肠杆菌 DH5a, 经菌落 PCR 和酶切鉴定阳性克隆 pROKII-GDH, 挑选阳性克隆转化入农杆菌 LBA4404 中。

30



### 9. 啤酒酵母、双孢菇谷氨酸脱氢酶基因亚克隆入植物表达载体 pROKII

从 pT—GDH 载体上用 XbaI、SacI 双酶切将 GDH 基因片段切下，经琼脂糖电泳回收后，与经同样酶切的 pROKII 载体在 4℃ 酶连过夜。次日转化大肠杆菌 DH5a，经菌落 PCR 和酶切鉴定阳性克隆 pROKII-GDH，挑选阳性克隆转化入农杆菌 LBA4404 中。

### 10. 根癌农杆菌介导的叶盘转化法转化烟草

#### (1) 烟草无菌苗的培养

将烟草种子表面消毒后培养在无激素的 MS 培养基(MS 盐 + 15g/L 蔗糖 + 8g/L 琼脂)上培养。25-28℃，80μE(m<sup>2</sup>. S)光照 16 小时，随着小苗的生长(1—1.5 个月以后)，将茎尖切下，转到新的 MS 培养基生成小植株。

#### (2) 烟草叶盘共培养

含重组质粒的根癌农杆菌接种于 5ml 含卡那霉素和利福平的培养基中，28℃ 200 转 / 分摇床培养过夜，离心收集菌体。将无菌苗叶片边缘和中脉用手术刀切去，沿中脉垂直方向将叶片切成 5—8mm 宽的叶条，叶片切割后立即放入农杆菌液中浸泡 30—40 分钟。用镊子取出共培养的叶片，放到无菌的滤纸上吸去过量的菌液，叶条移入含共培养培养基(MS 无机盐 + 0.6mg / 12, 4—D + 30g / 1 蔗糖 + 8g / 1 琼脂)的平皿中。用膜将平皿封口，以减少水分蒸发和污染。28℃ 暗培养 48hr。

### 11. 转化植株的筛选

将共培养叶片转移到愈伤组织诱导培养基(MS 无机盐 + 0.6mg / 12, 4—D + 300mg / 1 卡那霉素 + 500mg / 1 苄基青霉素 + 30g / 1 蔗糖 + 8g / 1 琼脂)上，使转化叶片充分接触培养基有利于营养和激素的吸收，在愈伤组织诱导培养基上培养两周后，将叶片转移到芽培养基(MS 无机盐，1mg / 1 IAA + 1mg / 16—BA + 300mg / 1 卡那霉素 + 500mg / 1 羧苄青霉素 + 30g / 1 蔗糖 + 8g / 1 琼脂)上培养。用解剖刀切下小芽转移到生根培养基(MS 无机盐 + 0.4mg / 1 IBA + 100mg / 1 卡那霉素 + 30g / 1 蔗糖 + 8g / 1 琼脂)上培养。

### 12. 基因枪法转化玉米

将基因枪放置于一较大超净台中，以利于无菌操作。取 6μl 包被 DNA 的金属颗粒无水乙醇悬浮液(约 0.6μg 质粒和 0.37μg 金属颗粒)点于微粒子载体中心，立即在干

燥器中干燥，或在工作台上吹干。将欲转化的靶组织中铺在一个由液体培养基润湿过的1-2层滤纸或含固体培养皿的9cm培养皿中心，抽真空，当真空度达到所需值(660—760mmHg, 1mmHg=133, 322Pa)时，进行轰击，约12秒钟打一枪。将轰击后的外植体转入愈伤组织诱导培养基或芽分化培养基，28℃，黑暗或弱光下培养，该培养基中不加入抗生素等筛选压力，过渡培养一般1—2周。过渡培养后的外植体在含适当卡那霉素的培养基上进行选择培养，1个月左右转入继代扩繁培养基中培养。

### 13. 花粉管通道法介导真菌 GDH 基因转化棉花

含 GDH 基因的 pROKII—GDH 载体溶于 1×SSC 溶液中，选择发育正常的花去雄，套袋隔离，授粉前一天将棉花花丝剪齐，在无菌培养皿中加入一薄层花粉萌发培养基，采集未萌发的新鲜花粉置于培养基中，在 30℃ 条件下培养 3 分钟左右，每 10ml 培养基中加入 30mm<sup>3</sup> 花粉，当约 1/10 的花粉已经萌发时，加入 1/10 体积的 DNA 溶液小心混匀，与花粉混合后 DNA 的终浓度为 5ug/ml，将 DNA 与花粉的混合液涂于柱头上，约 10mm<sup>3</sup> 处理后的花粉授一个雌穗，授粉后重新套袋隔离至种子成熟。

15

### 14. 农杆菌介导的真菌 GDH 基因转化水稻

含重组 GDH 基因的根癌农杆菌接种于 5ml 含卡那霉素和利福平液中，28℃ 200 转/分培养过夜，离心收集菌体，将无菌苗切割后立即放入农杆菌液中浸泡 30 分钟，取出叶片，放到无菌的滤纸上吸去过量的菌液，转入共培养基中培养。28℃ 暗培养 48hr。

20

### 15. 转真菌 GDH 基因植物阳性转化子的筛选和鉴定

#### (1) 从植物中抽提 DNA 方法

取 1g 植物叶片，加液氮研磨成粉末。加入 700 以 2xCTAB 提取液(2%(W/V)CTAB (十六烷基三乙基溴化铵)，100mmol/L Tris·Cl, pH8.0, 20mmol/L EDTA, 1.4mol/L NaCl)，轻轻摇匀，65℃水浴 30 分钟，其间不时摇动。加入 700ul 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)，并轻摇至溶液呈乳化状态，7000 转/分离心 5 分钟。取上清液继续用酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提 2-3 次，加 2 倍体积无水乙醇，混匀于-20℃沉淀过夜。7000 转/分离心 10 分钟，收集核酸沉淀，溶于去离子水中。 -20℃贮存备用。

30

## (2) 核酸杂交法鉴定阳性转化子

将抽提的植物总 DNA 酶切过夜, 酶切位点为 XbaI, SacI, 次日进行琼脂糖凝胶电泳。将 DNA 片段从凝胶电泳中转移至尼龙膜上, 紫外照射 3 分钟使 DNA 片段固定。将用地高辛(DIG)标记好的探针与尼龙膜上固定的 DNA 进行杂交, 杂交温度  
5 68℃, 时间 20 小时。杂交完成后, 清洗尼龙膜, 和抗地高辛的碱性磷酸酶(anti DIG—AP)反应 30 分钟, 清洗后进行 NBT / BCIP 显色。

结果, 在 1400bp 左右位置出现一条杂交带, 和阳性对照相同, 表明 GDH 基因已经整合入植物基因组中。

## 10 16. 转化植株的移栽和后代分析

小心移去植株根部的琼脂, 将植株转移至含 MS 无机盐溶液的较大容器里, 将盖子打开, 使气体扩散几小时, 同时加入一些无菌水以补充蒸发的液体, 之后把植株移栽到湿润的土壤里。所结种子以核酸杂交和 GDH 酶活染色测定后代分离, 直至获得纯合的转基因品系。

15

## 17. 凝胶分析和谷氨酸脱氢酶活性染色

在液氮中研磨, 提取植株叶片蛋白, 进行 5%非变性凝胶电泳, 120V72 小时。将凝胶浸泡在下述染色液中(50mMTrispH9.3, 8mg / ml 谷氨酸, 0.04mg / ml NADP, 0.04mg / ml MTT, 0.04mg / ml 硫酸的吩嗪, 0.08mg / mlCaCl<sub>2</sub>)。凝胶在染  
20 色液中浸泡后, 在含 GDH 的部位有一条带, 表明转化的 GDH 在植株体内表达出有活性谷氨酸脱氢酶。

## 18. 转基因植株的生长和氮素利用率测试

表达真菌 GDH 阳性植物收获种子后, 进行无菌苗的繁殖(同 8(1))。随着小苗的  
25 生长, 将茎尖切下, 转到不同氮含量的 MS 培养基上。氮的浓度分别为 20mM, 10mM, 5mM, 2.5mM, 以测试其生长状况。结果, 在 20mM, 10mM 的 MS 培养基上, 阳性转化子和对照组后代未显出明显区别。在 5mM 和 2.5mM 培养基上, 阳性转化子生长状况显著优于对照组, 而对照则出现叶片萎黄等缺氮症状。等植物生长 1—1.5 个月后, 将植株清洗干净, 烘干, 测试干重。结果显示, 阳性转化子比对照组干重  
30 增加 20%左右。同时利用凯氏定氮法, 测得转基因植株的含氮率比对照组增加 20—

30%左右。同时测定生长在 MS 培养基中植物的氮素利用率，转化植株较未转化植物的氮素利用率提高 20-30%左右。

## 序列表

<110> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences

<120> 一种提高植物氮素同化效率的方法

5 <160> 4

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 454 氨基酸

<212> 蛋白质

10 <213> 中间脉孢霉 *Neurospora intermedia*

<400>

MSNLPSEPEFEQAYKELAYTLENSSLFQKHPEYRTALTVASIPERVIOFRVWEDDNGNVO  
VNRGYRVQFNSALGPYKGGLRLHPSVNLSILKFLGFEOIFKNALTGLSMGGGKGGADFDPK  
GKSDAEIRRFCCAFMAELHKHIGADTDVPAGDIGVGGREIGYMFAYRKAANRFEGVLTG  
15 KGLSWGGSIRPEATGYGLVYYVGHMLEYSGAGSYAGKRVALSGSGNVAQYAALKLIELGA  
TVVSLSDSKGALVATGESGITVEDINAVMAIKEAROSLTSFOHAGHLKWIEGARFPLHVGK  
VDIALPCATONEVSKEEAEGLLAAGCKFVAEGSNMGCTLEAIEVFENHRKEKKGEAVWYA  
PGKAANCGGVAVSGLEMAQNSQRLNWTQAEVDEKLKDIMKNAFFNGLNTAKIYVEAAEG  
ELPSLVAGSNIAGFVKVAQAMHDOGDWWSKN

20

<210> SEQ ID NO: 2

<211> 1365 碱基对

<212> DNA

25 <213> 中间脉孢霉 *Neurospora intermedia*

<400>

ATGTCTAACCTTCCCTCTGAGCCCGAGTTTGAGCAGGCCTACAAGGAGTTGGCCTACAC  
TCTCGAGAACTCCTCCCTCTTCCAGAAGCACCCCGAGTACCGCACTGCCCTCACCGTTG  
CCTCCATCCCCGAGCGTGTCATTTCAGTTCCGTGTTGTCTGGGAGGACGACAACGGCAA  
30 CGTCCAGGTCAATCGCGGTTACCGTGTCCAGTTCAACTCCGCCCTCGGTCCCTACAAGG

GTGGTCTCCGTCTCCACCCCTCCGTCAACCTTTCCATTCTCAAGTTCCTCGGTTTCGAG  
CAGATCTTCAAGAATGCCCTCACTGGCTTGAGCATGGGTGGTGGCAAGGGTGGTGCCG  
ACTTCGACCCCAAGGGCAAGAGCGACGCTGAGATCCGTCGCTTCTGCTGCGCTTTCAT  
GGCTGAGCTTACAAGCACATTGGTGCCGATACCGATGTTCCCGCTGGTGACATCGGT  
5 GTTGGTGGCCGTGAGATCGGCTACATGTTTCGGTGCCTACCGCAAGGCCGCGAACCGTT  
TCGAGGGTGTCTTACTGGCAAGGGCCTCTCCTGGGGTGGTTCGCTCATTTCGCCCTGA  
GGCCACTGGTTACGGCCTCGTCTACTACGTCGGCCACATGCTCGAGTACTCTGGCGCCG  
GATCCTACGCTGGCAAGCGCGTTGCCCTCTCCGGTCCGGCAACGTCGCCCAGTACGC  
CGCCCTCAAGCTCATTGAGCTAGGCGCCACCGTTGTCTCCCTCTCCGACTCCAAGGGTG  
10 CTCTTGTCGCCACTGGCGAGTCCGGCATCACCGTTGAGGACATCAACGCCGTTATGGC  
CATCAAGGAGGCCCGTCAGTCCCTTACCAGCTTCCAGCACGCTGGTCACCTGAAGTGG  
ATCGAGGGCGCCCCGCCCTGGCTTACGTTGGCAAGGTTGACATCGCTCTTCCTTGCG  
CTACCCAGAACGAGGTCTCCAAGGAGGAGGCTGAGGGTCTCCTTGCCGCCGGCTGCAA  
GTTTCGTCGCTGAGGGTTCCAACATGGGCTGCACTCTCGAGGCCATTGAGGTCTTTGAG  
15 AACCACCGCAAGGAGAAGAAGGCGAGGCCGTCTGGTACGCCCCCGCAAGGCCGCC  
AACTGTGGTGGTGTGCGGTTTCCGGTCTCGAGATGGCTCAGAACAGCCAGCGCCTCA  
ACTGGACTCAGGCTGAGGTTGACGAGAAGCTCAAGGACATCATGAAGAACGCCTTCTT  
CAACGGTCTCAACACTGCCAAGATCTACGTCGAGGCTGCTGAGGGCGAGCTTCCTTCC  
CTCGTTGCTGGCTCCAACATTGCTGGTTTCGTCAAGGTTGCCCAAGGCCATGCACGACC  
20 AGGGTGACTGGTGGTCCAAGAACTAA

<210> SEQ ID NO: 3

<211> 454 氨基酸

25 <212> 蛋白质

<213> 好食脉孢霉 *Neurospora sitophila*

<400>

MSNLPSEPEFEQAYKELAYTLENSSLFOKHPEYRTALAVASIPERVIOFRVWEDDNGNVO  
VNRGYRVOFNSALGPYKGGLRLHPSVNLKFLGFEQIFKNALTGLSMGGGKGGADFDPK  
30 GKSDAEIIRRFCCAFMAELHKHIGADTDVPAGDIGVGGREIGYMFAYRKAANRFEGVLTG

KGLSWGGLIRPEATGYGLVYYVGHMLEYSGAGSYAGKRVALSGSGNVAOYAALKLIELGA  
TVVSLSDSKGALVATGESGITVEDINAIMAIKEAROSLTTFOHAGHVKWIEGARPWLHV GK  
VDIALPCATONEVSKEEAEGLLAAGCKFVAEGSNMGCTLEAIEVFENNRRKEKKGEAVWYA  
PGKAANCGGVAVSGLEMAONSORLNWTOAEVDEKLKDIMKNAFFNGLNTAKTYAEAAE  
5 GELPSLVAGSNIAGFVKVPOAMHDOGDWWSKN

<210> SEQ ID NO: 4

<211> 1365 碱基对

10 <212> DNA

<213> 好食脉孢霉 *Neurospora sitophila*

<400>

ATGTCTAACCTTCCCTCTGAGCCCGAGTTCGAGCAGGCCTACAAGGAGTTGGCCTACAC  
15 TCTCGAGAACTCCTCCCTCTTCCAGAAGCACCCCGAGTACCGCACCGCCCTCGCCGTTG  
CCTCCATCCCCGAGCGTGTCAATTCAGTTCCGTGTTGTCTGGGAGGACGACAACGGCAA  
CGTCCAGGTCAACCGCGGTTACCGTGTCCAGTTCAACTCCGCCCTCGGTCCCTACAAG  
GGTGGTCTCCGTCTCCATCCCTCCGTCAACCTTTCCATTCTCAAGTTCTCGGTTTCGA  
GCAGATCTTCAAGAAATGCCCTTACTGGCCTGAGCATGGGTGGTGGCAAGGGTGGTGCC  
20 GACTTCGACCCCAAGGGCAAGAGCGATGCTGAGATCCGTGCTTCTGCTGCGCTTTCA  
TGGCCGAGCTTCACAAGCACATTGGTGCCGATACCGATGTTCCCGCTGGTGATATTGGT  
GTTGGTGGCCGCGAGATCGGTTACATGTTTCGGTGCCTACCGCAAGGCTGCGAACCGTT  
TCGAGGGTGTCTTACTGGTAAGGGCCTCTCCTGGGGTGGTTCGCTCATTCGCCCTGA  
GGCCACTGGTTACGGTCTCGTCTACTACGTCCGCCACATGCTCGAGTACTCTGGCGCCG  
25 GCTCCTACGCTGGCAAGCGCGTTGCCCTCTCTGGTTCCGGCAACGTCGCCCGAGTACGC  
CGCCCTCAAGCTCATTGAGCTAGGCGCCACCGTTGTCTCCCTCTCCGACTCCAAGGGTG  
CCCTTGTCGCCACTGGCGAGTCCGGCATCACTGTTGAGGACATCAACGCCATCATGGC  
CATCAAGGAGGCCCGTCAGTCTCTTACCACCTTCCAGCACGCTGGCCACGTCAAGTGG  
ATCGAGGGCGCCCGCCCTGGCTTACGTTGGCAAGGTTGACATCGCTCTTCCTTGCG  
30 CTACCCAGAACGAGGTCTCCAAGGAGGAGGCTGAGGGTCTCCTTGCCGCCGGCTGCAA

GTTCGTCGCTGAGGGTTCCAACATGGGCTGCACTCTCGAGGCCATCGAGGTCTTTGAG  
AACAACCGCAAGGAGAAGAAGGGCGAGGCCGTCTGGTACGCCCCCGGCAAGGCCGCC  
AACTGTGGTGGTGTGCGGTTTCCGGTCTCGAGATGGCTCAGAACAGCCAGCGCCTCA  
ACTGGACTCAGGCTGAGGTTGACGAGAAGCTCAAGGACATCATGAAGAACGCCTTCTT  
5 CAACGGTCTCAACACTGCCAAGACCTACGCCGAGGCTGCTGAGGGCGAGCTTCCTTCC  
CTCGTTGCCGGCTCCAACATTGCTGGTTTCGTCAAGGTACCCCAGGCCATGCACGACCA  
GGGTGACTGGTGGTCCAAGAACTAA



### 权 利 要 求

1. 一种提高植物氮素同化效率的方法, 包括: (a) 将真菌谷氨酸脱氢酶 (GDH) 基因与一种可在植物中引导外源基因表达的启动子相连, 构建嵌合基因: (b) 将构建的嵌合基因导入植物细胞中, 筛选并培养出被转化的植株。  
5
2. 按照权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述的真菌谷氨酸脱氢酶基因是辅基 NADP 谷氨酸脱氢酶基因或辅基 NAD 谷氨酸脱氢酶基因。
3. 按照权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述的真菌谷氨酸脱氢酶基因来自丝状真菌的脉孢霉属真菌。
- 10 4. 按照权利要求 3 所述的方法, 其中, 所述的丝状真菌的脉孢霉属真菌包括中间脉孢霉、好食脉孢霉、粗糙脉孢霉。
5. 按照权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述的谷氨酸脱氢酶基因来自酵母真菌。
6. 按照权利要求 5 所述的方法, 其中, 所述的酵母真菌是啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。
- 15 7. 按照权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述的谷氨酸脱氢酶基因来自担子菌。
8. 按照权利要求 7 所述的方法, 其中, 所述的担子菌是双孢菇 (*Agaricus bisporus*)。
9. 按照权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述的植物是烟草、玉米、棉花或水稻。
10. 按照权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述的谷氨酸脱氢酶来自中间脉孢霉  
20 *Neurospora intermedia* 的谷氨酸脱氢酶, 它具有 SEQ ID NO: 1 所示的序列。
11. 按照权利要求 10 所述的方法, 其中, 所述的谷氨酸脱氢酶的基因具有 SEQ ID NO: 2 所示的序列。
12. 按照权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述的谷氨酸脱氢酶来自好食脉孢霉 *Neurospora sitophila*, 它具有 SEQ ID NO: 3 所示的序列。
- 25 13. 按照权利要求 12 所述的方法, 其中, 所述的谷氨酸脱氢酶基因具有 SEQ ID NO: 4 所示的序列。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN01/00294

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>7</sup>: C12N15/53, C12N9/04, C12N15/82, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>7</sup>: C12N15/53, C12N9/04, C12N15/82, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, CNPT, BIOSIS, CA

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
A	WO2000/28006 A2 2000-05-18 See the abstract	1-13
A	US5998700 A 1999-12-07 See the abstract	1-13
A	WO97/12983 A1 1997-04-10 See the abstract	1-13
A	WO99/51756 A2 1999-10-14 See the abstract	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- A- document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- E- earlier document but published on or after the international filing date
- L- document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- O- document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- P- document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- T- later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- X- document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- Y- document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- &- document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 July 2001 (05.07.01)

Date of mailing of the international search report

19 JUL 2001 (19.07.01)

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office  
6, Xitucheng Road, Haidian District,  
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-010-62019451

Authorized officer

ZENG Fanhui

Telephone No. 86-010-62093743

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN01/00294

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO2000/28006 A2	2000.05.18	AU200014668 A	2000.05.29
US5998700 A	99.12.07	CA2180786 A	98.01.03
WO97/12983 A1	97.04.10	AU7255696 A	1997.04.28
		EP0859849 A1	1998.08.26
		CN1198777 A	1998.11.11
		US5879941 A	1999.03.09
		JP11512618T T	1999.11.02
WO99/51756 A2	1999.10.14	ES2143408 A1	2000.05.01
		AU4257599 A	1999.10.25

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN01/00294

A. 主题的分类

Int.Cl<sup>7</sup>: C12N15/53, C12N9/04, C12N15/82, A01H5/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

Int.Cl<sup>7</sup>: C12N15/53, C12N9/04, C12N15/82, A01H5/00

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI, CNPT, BIOSIS, CA

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
A	WO2000/28006 A2 2000-05-18 见摘要	1-13
A	US5998700 A 1999-12-07 见摘要	1-13
A	WO97/12983 A1 1997-04-10 见摘要	1-13
A	WO99/51756 A2 1999-10-14 见摘要	1-13

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

\* 引用文件的专用类型:

"A" 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件

"E" 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的

"L" 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

"P" 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

"T" 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

"X" 特别相关的文件; 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

"Y" 特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

"&" 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

05.7月 2001(05.07.01)

国际检索报告邮寄日期

19.7月 2001(19.07.01)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局

中国北京市海淀区西土城路6号(100088)

传真号:

86-010-62019451

受权官员



电话号码: 010-62093733

国际检索报告  
同族专利成员的情报

国际申请号

PCT/CN01/00294

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO2000/28006 A2	2000.05.18	AU200014668 A	2000.05.29
US5998700 A	99.12.07	CA2180786 A	98.01.03
WO97/12983 A1	97.04.10	AU7255696 A	1997.04.28
		EP0859849 A1	1998.08.26
		CN1198777 A	1998.11.11
		US5879941 A	1999.03.09
		JP11512618T T	1999.11.02
WO99/51756 A2	1999.10.14	ES2143408 A1	2000.05.01
		AU4257599 A	1999.10.25

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**